

P A T E N T C O O P E R A T I O N T R E A T Y

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 07 May 2001 (07.05.01)	
International application No. PCT/EP00/06214	Applicant's or agent's file reference 1999/116 WO
International filing date (day/month/year) 04 July 2000 (04.07.00)	Priority date (day/month/year) 15 July 1999 (15.07.99)
Applicant KISSEL, Thomas et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 27 January 2001 (27.01.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Athina Nickitas-Etienne Telephone No.: (41-22) 338.83.38
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

PATENTANWALTSKANZLEI ZOUNEK
Industriepark Kalle-Albert
Gebäude H391
Rheingaustrasse 190-196
65174 Wiesbaden
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 04 février 2002 (04.02.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 99/074 MED	
International application No. PCT/EP00/06214	International filing date (day/month/year) 04 juillet 2000 (04.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning:
☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address SCHMIDT, Werner LTS Lohmann Therapie-Systeme AG Postfach 1525 56605 Andernach Germany	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 02362 992362	
	Facsimile No. 02632 992387	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:
☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address PATENTANWALTSKANZLEI ZOUNEK Industriepark Kalle-Albert Gebäude H391 Rheingaustrasse 190-196 65174 Wiesbaden Germany	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 0611-962-6041	
	Facsimile No. 0611-962-9205	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:
Please also note the change in the agent's file reference number.

4. A copy of this notification has been sent to:

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office | <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority | <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned |
| <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority | <input checked="" type="checkbox"/> other: SCHMIDT, Werner |

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer N. Wagner
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

6

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 1999/116WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/06214	International filing date (day/month/year) 04 July 2000 (04.07.00)	Priority date (day/month/year) 15 July 1999 (15.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C08G 81/00		
Applicant KISSEL, Thomas		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>20</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 January 2001 (27.01.01)	Date of completion of this report 11 October 2001 (11.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/06214

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1,5-10,12-28, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages 2-4.4a,11.11a, filed with the letter of 04 September 2001 (04.09.2001)
- ☒ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages 1-17, filed with the letter of 04 September 2001 (04.09.2001)
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1 - 17	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 17	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 17	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanationsNovelty (PCT Article 33(2)):

US-A-5 204 196 (D1) is a relevant document and describes polymers having a polyethylene imine backbone to which a polyethyleneglycol ether having the formula $\text{CH}_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m\text{O}-$ is bonded by isocyanate (D1, column 1, line 63 - column 2, line 8, and Examples 1 and 8). According to Example 1 of D1 (column 4, lines 1-3), the molar fraction of the PEO units is 64 %. In contrast, according to the application (cf. Claim 1, Formula II), the index "m" for the -Y-D unit is 1-200, that is, the molar fraction of the PEO units represented by -D is at least 100 % relative to the polyethylene imine structure. Therefore the claimed subject matter is novel over D1.

Inventive step (PCT Article 33(3)):

The object according to the application is the preparing of block copolymers suitable for complexing polynucleic acids in aqueous systems and as surfactants.

D1 concerns not this problem but solid conductive polymer compositions having high ion conductivity. Therefore D1 cannot contribute anything which would help to solve the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

problem addressed by the application; hence D1 does not suggest the claimed subject matter.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 15 OCT 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 1999/116 WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06214	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 04/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C08G81/00		
Anmelder KISSEL, Thomas		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 20 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 27/01/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Ehrenreich, W Tel. Nr. +49 89 2399 8675 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlag des Berichts

1. Hinsichtlich der **B standteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1,5-10,12-28 ursprüngliche Fassung

2-4,4a,11,11a eingegangen am 05/09/2001 mit Schreiben vom 04/09/2001

Patentansprüche, Nr.:

1-17 eingegangen am 05/09/2001 mit Schreiben vom 04/09/2001

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06214

☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Neuheit, Art. 33(2):

Relevantes Dokument ist US-A 5 204 196, D1, welches Polymere mit einem Polyethylenimin-Rückgrat beschreibt, an das mittels Isocyanat ein Polyethylen-glycolether der Formel $\text{CH}_3\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_m\text{O-}$ gebunden ist; D1, Sp. 1, Z. 63 bis Sp. 2, Z. 8 und die Beispiele 1 und 8. Gemäß Beispiel 1 von D1 (Sp. 4, Z. 1-3) beträgt die Molfraktion der PEO-Einheiten 64%. Demgegenüber ist anmeldungsgemäß (vgl. Anspruch 1, Formel II) der Index "m" für die Einheit -Y-D 1-200, d.h. die Molfraktion der durch -D repräsentierten PEO-Einheiten ist mindestens 100%, bezogen auf das Polyethylenimin-Gerüst. Der beanspruchte Gegenstand ist daher gegenüber D1 neu.

Erfinderische Tätigkeit, Art. 33(3):

Die anmeldungsgemäße Aufgabe besteht in der Bereitstellung von Blockcopolymeren, die sich zur Komplexierung von Polynucleinsäuren in wässrigen Systemen und als Tenside eignen.

D1 befaßt sich nicht mit dieser Problematik, sondern mit festen leitfähigen Polymerzusammensetzungen mit hoher Ionenleitfähigkeit. Somit konnte D1 nichts zur Lösung des anmeldungsgemäßen Problems beitragen, so daß D1 den beanspruchten Gegenstand nicht nahelegt.

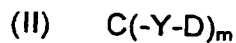
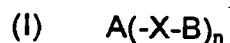
THIS PAGE BL NK (USPTO)

Austauschseite 2

2. In allen Fällen wurde dazu der reaktive Terminus des hydrophilen, nichtionischen Polymers für die Kopplungsreaktion mit dem kationischen Polymer durch ein Reagenz aktiviert, das im erzeugtem Copolymer ein Brückenglied zwischen den Blöcken darstellt.
3. Das hydrophile, nichtionische Polymer war in allen Fällen ein lineares Polymer.

Weiterhin sind aus US-A 5 204 196 Polymere bekannt, die ein PEI-Rückgrat enthalten, an das mittels eines Isocyanats ein Polyethylenglykoether der Formel $-O(CH_2-CH_2)_n-CH_3$ gebunden ist. Diese Polymere werden in Kombination mit anorganischen Salzen als feste elektrische Leiter verwendet.

Es wurden neue kationische Blockcopolymere der allgemeinen Formel I und II



gefunden, worin

- A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10.000.000 g/mol, vorzugsweise von 1.000 bis 100.000 g/mol und insbesondere von 5.000 bis 50.000 g/mol steht;
- B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol, vorzugsweise von 400 bis 100.000 g/mol und insbesondere von 400 bis 50.000 g/mol steht;
- X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Austauschseite 3

-OC(O)NH(CH₂)_oNHC(O)- mit o = 1 bis 20, vorzugsweise 2 bis 10, insbesondere 4 bis 6,

-OC(O)NH(Aryl)NHC(O)- mit Aryl = aromatische Einheit mit vorzugsweise 6 – 14 C-Atomen bestehend aus einem oder mehreren aromatischen Kernen, die in kondensierter oder in polyphenylischer Form miteinander verbunden sind, vorzugsweise mit einem Kern, insbesondere Toluyl-,

-O(CH₂)_pC(O)- mit p = 1 bis 10, vorzugsweise 1 bis 3, insbesondere 1,

-OCH₂CH(OH)CH₂-,

-OC(O)-, oder

-O(CH₂)_q- mit q = 1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 3;

n für eine ganze Zahl von 1) 1 bis 200, vorzugsweise,

2) 1 bis 50,

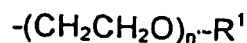
3) 1 bis 12,

4) 1 bis 8 oder, besonders bevorzugt,

5) 2 bis 8 steht;

C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol, vorzugsweise von 400 bis 100.000 g/mol und insbesondere von 400 bis 50.000 g/mol steht;

D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel



steht, worin n' = 3 bis 25.000, vorzugsweise 10 bis 5.000 und insbesondere 10 bis 1.000 ist und R¹ für Wasserstoff, einen aliphatischen Rest wie (C₁-C₆)-Alkyl (Methyl, Ethyl, tert.-Butyl und dergleichen) oder eine andere OH-Schutzgruppe

GEAENDERTES BLATT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

wie Acyl (z.B. ggf. substituiertes Benzoxy-carbonyl), ggf. substituiertes Benzyl, Picolyl, oder einen zellulären Liganden, um die spezifische Aufnahme eines Nukleinsäure-Copolymer-Komplexes durch Bindung an Zelloberflächenproteine, insbesondere Rezeptoren, zu bewirken, steht;

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:

$-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{Aryl})\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ mit Aryl = aromatische Einheit mit vorzugsweise 6 bis 14 C-Atomen bestehend aus einem oder mehreren aromatischen Kernen, die in kondensierter oder in polyphenylischer Form miteinander verbunden sind, vorzugsweise mit einem Kern, insbesondere Toluy-,

$-(\text{CH}_2)_t\text{C}(\text{O})\text{O}-$ mit $t = 2$ bis 10, vorzugsweise 2 bis 3, insbesondere 2,

$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}-$, oder

$-(\text{CH}_2)_u\text{O}-$ mit $u = 1$ bis 20, vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 3;

und

m für eine ganze Zahl von 1) 1 bis 200, vorzugsweise

2) 1 bis 100, insbesondere

3) 1 bis 50 steht,

mit der Maßgabe, daß die Reste und Variablen in Formel II so definiert sind, daß keine Verbindungen der Formel I davon umfaßt werden.

Die erfindungsgemäßen kationischen Blockcopolymeren unterscheiden sich von den bekannten Blockcopolymeren in mindestens einem der drei folgenden Merkmalen:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Austauschseite 4a

Ein hydrophiles, nichtionisches Polymer ist mit Seitenarmen eines kationischen Polymers versehen.

1. Die Brückenglieder unterscheiden sich von jenen bekannter Blockcopolymeren.
2. Sie weisen ein verzweigtes hydrophiles, nichtionisches Polymer auf.

Unter A werden vorzugsweise aus Kohlenstoff und Sauerstoff aufgebaute lineare oder verzweigte Polymere, die gegebenenfalls auch cyclische, sternförmige oder dendritische Strukturen enthalten können, wie beispielsweise Reste von linearem PEG, mehrarmig verzweigten PEG, sternförmige PEG, Polysaccharide einschließlich Cyclodextrine, PVA, Arborole (Dendrimere mit endständigen Hydroxygruppen),

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Darüber hinaus können die Blockcopolymere auch

- in Klebstoff- und Lacksystemen als Additiv
 - als Fixiermittel zur Verbesserung der Papierfestigkeit
 - als Primer für Polymerverbundsysteme wie z. B. mehrlagige Verpackungsfolien
 - zur Kunststoffmodifizierung (Verbesserung der Anfärbbarkeit, Lackierbarkeit, Barrierewirkung)
 - zur Fixierung von Reaktivfarbstoffen auf Baumwolle
 - als Flockungs- und Dispergiermittel bei feinverteilten Schwebstoffen in industriellen Abwässern
 - zur Bindung von Schwermetallsalzen
 - zur Dispergierung organischer und anorganischer Pigmente
 - als Zusatz in keramischen und zementösen Bestandteilen
 - für verschiedenste Funktionen in der Haut- und Haarkosmetik sowie im Dentalbereich
 - zur Fixierung von medizinischen Wirkstoffen oder biologisch aktiven Verbindungen auf Oberflächen
 - zur Filtration von Endotoxinen und Pathogenen aus Blutplasma
 - zur Penetration durch Schleimhäute
- verwendet werden.

Zudem bilden die Blockcopolymere in wäßrigen Systemen Komplexe mit Polynukleinsäuren, wie DNA und RNA einschließlich Ribozymen. Aufgrund dieser Eigenschaft sind sie geeignet als Vehikel oder Vektoren für den Gentransfer (Penetration durch Zellmembranen und Translokation in den Zellkern). Sie können daher in Transfektionsexperimenten, in der Gentherapie und Diagnostik Anwendung finden (siehe Abschnitt „Biologische Beispiele“).

Die Erfindung betrifft daher insbesondere auch die Verwendung von Verbindungen der Formel I oder II, die wie oben definiert sind und in denen darüber hinaus Y für -C(O)NH(CH₂)_sNHC(O)O- mit s = 1 bis 20, vorzugsweise 2 bis 10, insbesondere 4 bis 6 stehen kann, zur Komplexierung von Polynukleinsäuren, wie DNA, RNA und

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ribozymen, in wäßrigen Systemen, sowie Zusammensetzungen, die mindestens eine solche Nukleinsäure und eine Verbindung der Formel I oder II umfassen.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der im vorstehenden Absatz definierten Verbindungen der Formel I oder II als Tenside.

Die folgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung, ohne daß diese darauf beschränkt wäre.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Austauschseite 29

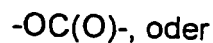
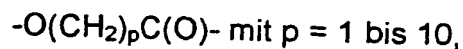
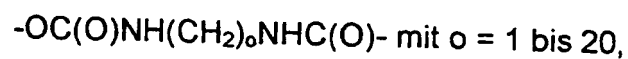
Neue Patentansprüche

1. Verbindung der Formel I oder II



in welcher

- A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10.000.000 g/mol steht;
- B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol steht;
- X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:

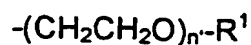


n für eine ganze Zahl 1 bis 200 steht;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

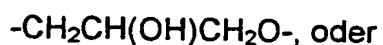
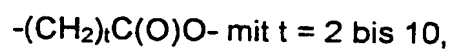
Austauschseite 30

- C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol;
- D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel



steht, worin $n' = 3$ bis 25.000 ist und R^1 Wasserstoff, ein aliphatischer Rest oder eine andere OH-Schutzgruppe oder ein zellulärer Ligand ist;

- Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:



und

m für eine ganze Zahl von 1 bis 200 steht

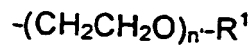
mit der Maßgabe, daß die Reste und Variablen in Formel II so definiert sind, daß keine Verbindungen der Formel I davon umfaßt werden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. Verbindung gemäß Anspruch 1, in welcher

- A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 1.000 bis 100.000 g/mol steht;
- B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 400 bis 100.000 g/mol steht;
- X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:
 - OC(O)NH(CH₂)_oNHC(O)- mit o = 2 bis 10,
 - OC(O)NH(Aryl)NHC(O)- mit Aryl = aromatische Einheit mit einem Kern,
 - O(CH₂)_pC(O)- mit p = 1 bis 3,
 - OCH₂CH(OH)CH₂-,
 - OC(O)-, oder
 - O(CH₂)_q- mit q = 1 bis 6,
- n für eine ganze Zahl von 1 bis 50,
- C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 400 bis 100.000 g/mol steht;
- D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel

THIS PAGE BLANK (USPTO)



steht, worin $n' = 10$ bis 5.000 ist und R^1 Wasserstoff, ein aliphatischer Rest oder eine andere OH-Schutzgruppe oder ein zellulärer Ligand ist;

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:

$-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{Aryl})\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ mit Aryl = aromatische Einheit mit einem Kern,

$-(\text{CH}_2)_t\text{C}(\text{O})\text{O}-$ mit $t = 2$ bis 3 ,

$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}-$, oder

$-(\text{CH}_2)_u\text{O}-$ mit $u = 1$ bis 6 ;

und

m für eine ganze Zahl von 1 bis 100 steht,

mit der Maßgabe, daß die Reste und Variablen in Formel II so definiert sind, daß keine Verbindungen der Formel I davon umfaßt werden.

3. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, in welcher

A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 5.000 bis 50.000 g/mol steht;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Austauschseite 33

- B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 400 bis 50.000 g/mol steht;
- X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:
- OC(O)NH(CH₂)_oNHC(O)- mit o = 4 bis 6,
- OC(O)NH(Aryl)NHC(O)- mit Aryl = Toluy-,
- O(CH₂)_pC(O)- mit p = 1,
- OCH₂CH(OH)CH₂-,
- OC(O)-, oder
- O(CH₂)_q- mit q = 1 bis 3;
- n für eine ganze Zahl von 1 bis 12 steht;
- C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 400 bis 50.000 g/mol steht;
- D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel
- $$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^1$$
- steht, worin n' = 10 bis 1.000 ist und R¹ Wasserstoff, ein aliphatischer Rest oder eine andere OH-Schutzgruppe oder ein zellulärer Ligand ist;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Austauschseite 34

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:

$-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{Aryl})\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ mit Aryl = Toluyl-,

$-(\text{CH}_2)_t\text{C}(\text{O})\text{O}-$ mit $t = 2$,

$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}-$, oder

$-(\text{CH}_2)_u\text{O}-$ mit $u = 1$ bis 3 ;

und

m für eine ganze Zahl von 1 bis 50 steht

mit der Maßgabe, daß die Reste und Variablen in Formel II so definiert sind, daß keine Verbindungen der Formel I davon umfaßt werden.

4. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, welche die Formel I aufweist.
5. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, welche die Formel II aufweist.
6. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, in welcher X für ein Brückenglied der Formel $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NHC}(\text{O})-$ steht.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. Verwendung einer Verbindung der Formel II, in welcher Y für ein Brückenglied der Formel $-C(O)NH(CH_2)_sNHC(O)O-$ mit $s = 1 - 10$ steht und die übrigen Reste wie in einem der Ansprüche 1 bis 3 definiert sind, zur Komplexierung von Polynukleinsäuren in wäßrigen Systemen.

8. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel I gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) Verbindungen der allgemeinen Formel V

(V) $A-(OH)_n$ mit A und $n =$ wie in Formel I

mit Diisocyanat umgesetzt, oder

 - b) Verbindungen der allgemeinen Formel VI

(VI) $A-(NH_2)_n$ (mit A und $n =$ wie in Formel I definiert)

bei der Polymerisation von Ethylenimin dem Reaktionsansatz von Beginn der Polyreaktion an oder erst später im Verlauf der Polyreaktion zufügt, oder

 - c) Verbindungen der allgemeinen Formel VII

(VII) $A-(OS(O)_2R^4)_n$ mit A wie in Formel I und $R^4 =$ aliphatischer oder aromatischer Rest als Makroinitiator für die Polymerisation von Ethylenimin einsetzt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Austauschseite 35a

9. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel II gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der allgemeinen Formel IX

(IX) D-OH (mit D wie in Formel II definiert)

zunächst mit Diisocyanat und anschließend die erhaltene Verbindung mit linearem oder verzweigtem Polyethylenimin umsetzt.

(VIII)

10. Verwendung einer Verbindung der Formel I oder II

(I) $A(-X-B)_n$ (II) $C(-Y-D)_m$

in welcher

- A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10.000.000 g/mol steht;
- B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol steht;
- X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:

$-OC(O)NH(CH_2)_oNHC(O)-$ mit $o = 1$ bis 20,

$-OC(O)NH(Aryl)NHC(O)-$ mit Aryl = aromatische Einheit ,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Austauschseite 35b

$-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{O})-$ mit $p = 1$ bis 10 ,

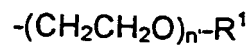
$-\text{OC}(\text{O})-$, oder

$-\text{O}(\text{CH}_2)_q-$ mit $q = 1$ bis 20 ;

n für eine ganze Zahl 1 bis 200 steht;

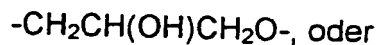
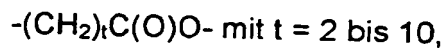
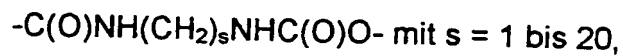
C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 100 bis $1.000.000$ g/mol;

D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel



steht, worin $n' = 3$ bis 25.000 ist und R^1 Wasserstoff, ein aliphatischer Rest oder eine andere OH-Schutzgruppe oder ein zellulärer Ligand ist;

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Austauschseite 35c

und

m für eine ganze Zahl von 1 bis 200 steht,

mit der Maßgabe, daß die Reste und Variablen in Formel II so definiert sind, daß keine Verbindungen der Formel I davon umfaßt werden,

zur Komplexierung von Polynukleinsäuren in wäßrigen Systemen.

11. Verwendung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel I oder II, worin

A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 1.000 bis 100.000 g/mol steht;

B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 400 bis 100.000 g/mol steht;

X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:

$\text{-OC(O)NH(CH}_2\text{)}_o\text{NHC(O)-}$ mit $o = 2$ bis 10,

$\text{-OC(O)NH(Aryl)NHC(O)-}$ mit Aryl = aromatische Einheit mit einem Kern,

$\text{-O(CH}_2\text{)}_p\text{C(O)-}$ mit $p = 1$ bis 3,

$\text{-OCH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{-}$,

IS PAGE BLANK (USPTO)

Austauschseite 35d

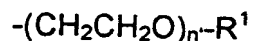
-OC(O)-, oder

-O(CH₂)_q- mit q = 1 bis 6,

n für eine ganze Zahl von 1 bis 50,

C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 400 bis 100.000 g/mol steht;

D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel



steht, worin n' = 10 bis 5.000 ist und R¹ Wasserstoff, ein aliphatischer Rest oder eine andere OH-Schutzgruppe oder ein zellulärer Ligand ist;

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:

-C(O)NH(CH₂)_sNHC(O)O- mit s = 2 bis 10,

-C(O)NH(Aryl)NHC(O)O- mit Aryl = aromatische Einheit mit einem Kern,

-(CH₂)_tC(O)O- mit t = 2 bis 3,

-CH₂CH(OH)CH₂O-, oder

-(CH₂)_uO- mit u = 1 bis 6;

und

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Austauschseite 35e

m für eine ganze Zahl von 1 bis 100 steht,

mit der Maßgabe, daß die Reste und Variablen in Formel II so definiert sind, daß keine Verbindungen der Formel I davon umfaßt werden,

verwendet wird.

12. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel I oder II, worin

- A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 5.000 bis 50.000 g/mol steht;
- B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 400 bis 50.000 g/mol steht;
- X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:

$\text{-OC(O)NH(CH}_2\text{)}_o\text{NHC(O)-}$ mit $o = 4$ bis 6,

$\text{-OC(O)NH(Aryl)NHC(O)-}$ mit Aryl = Toluyl-,

$\text{-O(CH}_2\text{)}_p\text{C(O)-}$ mit $p = 1$,

$\text{-OCH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{-}$,

-OC(O)- , oder

THIS PAGE BLANK (USPTO)

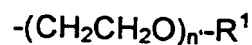
Austauschseite 35f

$-\text{O}(\text{CH}_2)_q-$ mit $q = 1$ bis 3 ;

n für eine ganze Zahl von 1 bis 12 steht;

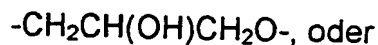
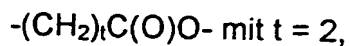
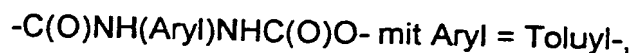
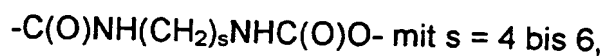
C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 400 bis 50.000 g/mol steht;

D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel



steht, worin $n' = 10$ bis 1.000 ist und R^1 Wasserstoff, ein aliphatischer Rest oder eine andere OH-Schutzgruppe oder ein zellulärer Ligand ist;

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht, dessen C-terminale Seite mit einem Stickstoffatom des PEIs verknüpft ist:



und

m für eine ganze Zahl von 1 bis 50 steht,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Austauschseite 35g

mit der Maßgabe, daß die Reste und Variablen in Formel II so definiert sind, daß keine Verbindungen der Formel I davon umfaßt werden,

verwendet wird.

13. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 zur Komplexierung von DNA in wäßrigen Systemen.
14. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 zur Komplexierung von RNA in wäßrigen Systemen.
15. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 zur Komplexierung von Ribozymen in wäßrigen Systemen.
16. Zusammensetzung, die mindestens eine Nukleinsäure und eine Verbindung der Formel I oder II, die wie in einem der Ansprüche 10 bis 12 definiert ist, umfaßt.
17. Verwendung einer Verbindung der Formel I oder II, die wie in einem der Ansprüche 10 bis 12 definiert sind, als Tensid.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Januar 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/05875 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C08G 81/00,
C12N 15/87

(DE). KUNATH, Klaus [DE/DE]; Emil-von-Behring-Str.
13, 35041 Marburg (DE). VON HARPE, Anke [DE/DE];
Am Engelsberg 31, 35041 Marburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06214

(74) Anwalt: SCHMIDT, Werner; LTS Lohmann Therapie-
Systeme AG, Postfach 1525, 56605 Andernach (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Juli 2000 (04.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, BR, CA, CN, CZ,
HU, IL, IN, JP, KR, MX, NZ, PL, RU, TR, US, ZA.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:
199 33 024.7 15. Juli 1999 (15.07.1999) DE

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: KISSEL, Thomas [DE/DE]; Im Steiner 9,
79219 Staufen (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): PETERSEN, Holger
[DE/DE]; Am Weinberg 17, 35037 Marburg (DE). FIS-
CHER, Dagmar [DE/DE]; Schuhmarkt 2, 35037 Marburg

(54) Title: CATIONIC BLOCK COPOLYMERS

(54) Bezeichnung: KATIONISCHE BLOCKCOPOLYMERE

(57) Abstract: The invention relates to cationic block copolymers of formula A(-X-B)_n or C(-Y-D)_m, wherein A represents a hydrophilic polymer, B represents polyethyleneimine (PEI), X represents a bridge, n represents 1-200, C represents PEI, D represents the residue of a polyethylene glycol, Y represents a bridge and m represents 1-200. The invention also relates to methods for producing the inventive cationic block polymers and to their use e.g. as a tenside and for complexing nucleic acids.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft kationische Blockcopolymere der Formel A(-X-B)_n oder C(-Y-D)_m, in welchen A für ein hydrophiles Polymer, B für Polyethylenimin (PEI), X für eine Brücke, n für 1 - 200, C für PEI, D für den Rest eines Polyethylenglykols, Y für eine Brücke und m für 1 - 200 stehen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung u.a. als Tensid und zur Komplexierung von Nukleinsäuren.

WO 01/05875 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Kationische Blockcopolymere

Beschreibung

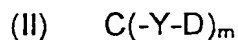
- 5 Aus der WO98/59064 sind PEI-PEG-Blockcopolymere und deren Verwendung als Vehikel für den Transport von Nukleinsäure in höhere eukaryotische Zellen bekannt. Das beschriebene Copolymer wurde aus verzweigten PEI und linearen PEG aufgebaut. Für die PEGylierung des PEI wurde Methoxy-succinimidyl-propionat-PEG verwendet.
- 10 S. V. Vinogradov, T. K. Bronich und A. V. Kabanov (Bioconjugate Chem. 1998, 9, 805-812) beschreiben die Darstellung von PEI-PEG- und Polyspermin-PEG-Blockcopolymere durch Verwendung von verzweigtem PEI und verzweigtem Polyspermine durch Kopplungsreaktion mit einem mit 1,1'-Carbonyldiimidazol
- 15 aktivierten MonomethoxyPEG. Die Copolymere wurden für die Komplexierung mit Oligonukleotiden verwendet.
- In L. M. Bronstein, M. Antonietti, et. al. (Inorganica Chimica Acta 1998, 280, 348-354) werden PEI-PEG-Blockcopolymere und deren Herstellung durch Kopplung von
- 20 verzweigtem PEI mit MonomethoxyPEG, das über eine endständige Säurechloridfunktion verfügt, und deren Verwendung zur Darstellung von Metallkolloiden beschrieben.
- V. Toncheva et al. (Biochimica et Biophysica Acta 1998, 138, 354 – 358) betrifft
- 25 Blockcopolymere, bestehend aus Poly(L-lysin) und mehreren hydrophilen Polymeren, wie PEG, Dextran und Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Vehikel für den Gentransfer von Nukleinsäure.
- 30 Diese bekannten Blockcopolymere haben folgende drei Punkte gemeinsam:
1. Das kationische Polymer ist mit Seitenarmen eines hydrophilen, nichtionischen Polymers versehen.

2. In allen Fällen wurde dazu der reaktive Terminus des hydrophilen, nichtionischen Polymers für die Kopplungsreaktion mit dem kationischen Polymer durch ein Reagenz aktiviert, das im erzeugtem Copolymer ein Brückenglied zwischen den Blöcken darstellt.

5

3. Das hydrophile, nichtionische Polymer war in allen Fällen ein lineares Polymer.

Es wurden neue kationische Blockcopolymere der allgemeinen Formel I und II



gefunden, worin

15

- A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10.000.000 g/mol, vorzugsweise von 1.000 bis 100.000 g/mol und insbesondere von 5.000 bis 50.000 g/mol steht;

- 20 B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol, vorzugsweise von 400 bis 100.000 g/mol und insbesondere von 400 bis 50.000 g/mol steht;

- X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit
25 folgenden Strukturen steht:

$-OC(O)NH(CH_2)_oNHC(O)NH-$ mit $o = 1$ bis 20, vorzugsweise 2 bis 10, insbesondere 4 bis 6,

- 30 $-OC(O)NH(Aryl)NHC(O)NH-$ mit Aryl = aromatische Einheit mit vorzugsweise 6 – 14 C-Atomen bestehend aus einem oder mehreren aromatischen Kernen, die in kondensierter oder in polyphenylischer Form miteinander verbunden sind, vorzugsweise mit einem Kern, insbesondere Toluy-,

$-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ mit $p = 1$ bis 10, vorzugsweise 1 bis 3, insbesondere 1,

$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}-$,

5 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, oder

$-\text{O}(\text{CH}_2)_q\text{NH}-$ mit $q = 1$ bis 20, vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 3;

n für eine ganze Zahl von 1) 1 bis 200, vorzugsweise,

10

2) 1 bis 50,

3) 1 bis 12,

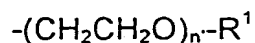
4) 1 bis 8 oder, besonders bevorzugt,

5) 2 bis 8 steht;

15 C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol, vorzugsweise von 400 bis 100.000 g/mol und insbesondere von 400 bis 50.000 g/mol steht;

D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel

20



steht, worin $n' = 3$ bis 25.000, vorzugsweise 10 bis 5.000 und insbesondere 10 bis 1.000 ist und R^1 für Wasserstoff, einen aliphatischen Rest wie (C_1 - C_6)-Alkyl (Methyl, Ethyl, tert.-Butyl und dergleichen) oder eine andere OH-Schutzgruppe wie Acyl (z.B. ggf. substituiertes Benzoxycarbonyl), ggf. substituiertes Benzyl, Picolyl, oder einen zellulären Liganden, um die spezifische Aufnahme eines Nukleinsäure-Copolymer-Komplexes durch Bindung an Zelloberflächenproteine, insbesondere Rezeptoren, zu bewirken, steht;

30

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

-NHC(O)NH(CH₂)_sNHC(O)O- mit s = 1 bis 20, vorzugsweise 2 bis 10, insbesondere 4 bis 6,

-NHC(O)NH(Aryl)NHC(O)O- mit Aryl = aromatische Einheit mit vorzugsweise 6 bis 14

- 5 C-Atomen bestehend aus einem oder mehreren aromatischen Kernen, die in kondensierter oder in polyphenylischer Form miteinander verbunden sind, vorzugsweise mit einem Kern, insbesondere Toluyl-,

-NH(CH₂)_tC(O)O- mit t = 2 bis 10, vorzugsweise 2 bis 3, insbesondere 2,

10

-NHCH₂CH(OH)CH₂O-, oder

-NH(CH₂)_uO- mit u = 1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 3;

15 und

m für eine ganze Zahl von 1) 1 bis 200, vorzugsweise

2) 1 bis 100, insbesondere

3) 1 bis 50 steht.

20

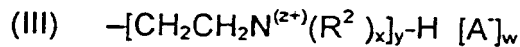
Die erfindungsgemäßen kationischen Blockcopolymeren unterscheiden sich von den bekannten Blockcopolymeren in mindestens einem der drei folgenden Merkmalen:

1. Ein hydrophiles, nichtionisches Polymer ist mit Seitenarmen eines kationischen
25 Polymers versehen.
2. Die Brückenglieder unterscheiden sich von jenen bekannter Blockcopolymeren.
3. Sie weisen ein verzweigtes hydrophiles, nichtionisches Polymer auf.

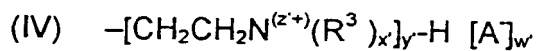
Unter A werden vorzugsweise aus Kohlenstoff und Sauerstoff aufgebaute lineare
30 oder verzweigte Polymere, die gegebenenfalls auch cyclische, sternförmige oder dendritische Strukturen enthalten können, wie beispielsweise Reste von linearem PEG, mehrarmig verzweigten PEG, sternförmige PEG, Polysaccharide einschließlich Cyclodextrine, PVA, Arborole (Dendrimere mit endständigen Hydroxygruppen),

vorzugsweise aber lineare und mehrarmig verzweigte und sternförmige PEGs verstanden. Letztere sind kommerziell u. a. von Aldrich, Fluka, Sigma und Shearwater erhältlich.

- 5 Unter B und C werden lineare oder verzweigte Polyethylenimin-Reste verstanden, welche die Formel III



- 10 aufweisen,
in welchen R^2 für gleiche oder verschiedene Reste steht und Wasserstoff oder einen Rest der Formel IV bedeutet,



- 15 R^3 für gleiche oder verschiedene Reste steht, die (rekursiv) wie R^2 definiert sind,
 A^- für ein Äquivalent eines geeigneten, vorzugsweise anorganischen Anions stehen, wie OH^- , Cl^- , Br^- und dergleichen,

- 20 x und x' gleich oder verschieden sind und 1 oder 2 bedeuten,
y und y' gleich oder verschieden sind und für ganze Zahlen stehen, die so gewählt werden, daß die Reste B bzw. C ein anteiliges Molekulargewicht von 100 bis
25 1.000.000 g/mol, vorzugsweise von 400 bis 100.000 g/mol und insbesondere von 400 bis 50.000 g/mol aufweisen, wobei y' auch 0 sein kann,

- z und z' gleich oder verschieden, $z = x-1$ und $z' = x'-1$ sind,

- 30 und

w und w' gleiche oder verschiedene ganze Zahlen sind, die so gewählt werden, daß die positiven Ladungen in den Resten der Formeln III und IV ausgeglichen werden.

Die Polyethylenimine können in an sich bekannter Weise hergestellt werden oder sind unter den BASF-Markennamen Lupasol® oder unter der Bezeichnung Polyethylenimin oder Ethylenimin Polymer in verschiedenen Molekulargewichten von 400 bis 2.000.000 g/mol im Handel (von Aldrich, Sigma, Fluka oder direkt von der BASF) erhältlich. Bevorzugt sind für B Polyethylenimine mit einem Molekulargewicht von 400 bis 2.000 g/mol und für C Polyethylenimine mit einem Molekulargewicht von 400 bis 800.000 g/mol, besonders bevorzugt von 400 bis 25.000 g/mol.

Die unter D beschriebenen Gruppen sind Reste von Polyethylenglykolen, die an einem Terminus durch einen Rest R^1 wie beispielsweise Methyl oder eine andere geeignete Schutzgruppe geschützt sind. R^1 kann aber auch eine Gruppe sein, die eine spezifische oder unspezifische biologische Funktion ausübt, insbesondere ein Ligand für Wechselwirkungen mit Rezeptoren zur zielzell-spezifischen Aufnahme eines Blockcopolymer-Wirkstoff-Komplexes in höhere eukaryotische Zellen und deren Zellkern, wobei der Wirkstoff vorzugsweise ein Oligonukleotid oder ein Gen darstellt (Gentargeting). R^1 kann somit auch ein Ligand für eine spezifische Wechselwirkung und Aufnahme in Zielorgan-gewebe oder -zellen, beispielsweise Proteine, insbesondere Antikörper oder Antikörperfragmente wie Fab, $F(ab)_2$, scFv, Cyto- oder Lymphokine, wie Interleukine (IL-2 bis x), Interferon GM-CSF, Wachstumsfaktoren, wie EGF, PDGF, FGF, EPO, Integrine wie ICAM, VCAM oder Glykoproteine wie Lektine oder glykosilierte Proteine (s. o.) oder Lipoproteine wie LDL, HDL oder Transporterproteine wie Transferrin oder Peptide wie LH-RH, Calcitonin, Oxytocin, Insulin, Somatostatin, IGF, RGD oder Kohlenhydrate wie Galactose, Mannose, Glucose, Lactose oder Hormone wie Steroide, THR oder Vitamine wie B_{12} , Folsäure sein.

30

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I, die dadurch gekennzeichnet sind, daß man

- a) Verbindungen der allgemeinen Formel V

(V) $A-(OH)_n$ mit A und $n =$ wie in Formel I

5 mit Diisocyanat, vorzugsweise Hexamethyldiisocyanat, umgesetzt und die daraus entstehende Verbindung mit Polyethyleniminen mit den allgemeinen Formeln III und IV umgesetzt, oder

- b) Verbindungen der allgemeinen Formel VI

10

(VI) $A-(NH_2)_n$ (mit A und $n =$ wie in Formel I definiert)

bei der Polymerisation von Ethylenimin dem Reaktionsansatz von Beginn der Polyreaktion an oder erst später im Verlauf der Polyreaktion zufügt, oder

15

- c) Verbindungen der allgemeinen Formel VII

(VII) $A-(OS(O)_2R^4)_n$ mit A wie in Formel I und $R^4 =$ aliphatischer oder aromatischer Rest, bevorzugt p-Toluy, Fluorid, Trifluormethyl oder Methyl,

20

als Makroinitiator für die Polymerisation von Ethylenimin einsetzt.

Verbindungen der Formel VI sind in verschiedenen Molekulargewichten kommerziell beispielsweise von Shearwater erhältlich.

25

Verbindungen der allgemeinen Formel VII werden durch die Umsetzung von Verbindungen der allgemeinen Formel V mit Verbindungen der allgemeinen Formel VIII

30 (VIII) $Cl-S(O)_2 R^4$ (R^4 wie oben definiert)

erhalten.

Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel II, die dadurch gekennzeichnet sind, daß man

d) Verbindungen der allgemeinen Formel IX

5

(IX) D-OH (mit D wie in Formel II definiert)

10

zunächst mit Diisocyanat, vorzugsweise Hexamethylendiisocyanat, und anschließend die erhaltene Verbindung mit linearem oder verzweigtem Polyethylenimin umgesetzt. Gegebenfalls zum Schutz von OH-Gruppen eingeführte Schutzgruppen können in an sich bekannter Weise abgespalten werden (s. z.B. Büllesbach, Kontakte (Merck) 1/1980, S. 23 ff.)

15

20

25

30

Das unter a) beschriebene Verfahren führt man vorzugsweise so durch, daß man je endständige Hydroxygruppe des Polymerblocks A einen 4 bis 20fachen Überschuß an Diisocyanat, vorzugsweise Hexamethylendiisocyanat, einsetzt. Die Reaktion wird in Chloroform bei Temperaturen von Raumtemperatur bis Siedetemperatur des Lösungsmittels, vorzugsweise aber bei Siedetemperatur des Lösungsmittels durchgeführt. Die Reaktionsdauer wird zwischen 2 und 24 Stunden gewählt, vorzugsweise jedoch 4 Stunden. Die Polymerkonzentration im Reaktionsansatzes liegt zwischen 10 g/l und 500 g/l, vorzugsweise 100 g/l. Das Produkt wird durch Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck und Entfernen des überschüssigen Diisocyanates durch mehrfache Extraktion mit Petrolether (Siedebereich: 40-60°C) isoliert. Dieses Zwischenprodukt wird je endständiger Hydroxygruppe der Ausgangsverbindung mit einem 3 bis 10fachen Überschuß an PEI-Makromoleküle umgesetzt. Die Reaktion wird in Chloroform bei Temperaturen von Raumtemperatur bis Siedetemperatur des Lösungsmittels, vorzugsweise aber bei Siedetemperatur des Lösungsmittels durchgeführt. Die Reaktionsdauer wird zwischen 6 und 72 Stunden gewählt, vorzugsweise jedoch 12 Stunden. Die Polymerkonzentrationen, sowohl die des PEI als auch die des mit Hexamethylendiisocyanat aktivierten nichtionische hydrophile Polymer im Reaktionsansatzes liegen zwischen 10 g/l und 500 g/l, vorzugsweise zwischen 30 - 200 g/l. Das Produkt wird durch Ausfällen des Polymers in einem 10 - 30fachen

Volumenüberschuß an Diethylether isoliert. Durch mehrmaliges Umfällen mit den Lösungsmittel Ethanol und Diethylether läßt sich das Blockcopolymer von überschüssigem PEI reinigen.

- 5 Das unter b) beschriebene Verfahren führt man durch, indem sowohl das Ethylenimin als auch das aminoterminierte hydrophile nichtionische Polymer in Wasser in einer Konzentration von jeweils 10 g/l bis 500 g/l vorgelegt werden. Das Molverhältnis der beiden Komponenten liegt zwischen 1 : 10 bis 1: 10.000. Dann wird die Ethylenimin-Polymerisation durch Zugabe eines geeigneten Katalysator, beispielsweise
- 10 Salzsäure, initiiert und der Ansatz auf eine Temperatur von 40 - 100°C gebracht. Das Copolymer wird durch eine Kettenabbruchreaktion erzeugt. Das Blockcopolymer wird durch mehrmaliges Umfällen mit Hilfe geeigneter Lösungsmittel, beispielsweise Ethanol und Diethylether und/oder durch Druckfiltration von möglicherweise als Nebenprodukt entstandenes Homopolymer PEI gereinigt. Eine Variation dieses
- 15 Herstellungsverfahrens besteht darin, daß man das aminoterminierte hydrophile nichtionische Polymer erst nach einer gewissen Reaktionsdauer von 30 Minuten bis zu 72 Stunden zu dem heißen Polymerisationsansatz zugibt.

- Das unter c) beschriebene Verfahren führt man durch, indem man die endständige(n)
- 20 Hydroxygruppe(n) des Polymerblocks A mit einem Sulfonsäurechlorid der allgemeinen Formel VIII, insbesondere jedoch mit Toluolsulfonsäurechlorid (Tosylchlorid) umsetzt. Diese Reaktion wird in wäßrigen und/oder polaren organischen Lösungsmittel, vorzugsweise in einem Wasser/Tetrahydrofuran-Gemisch, bei Temperaturen von -10°C bis Siedetemperatur des Lösungsmittel,
 - 25 bevorzugt bei Temperaturen von 0°C bis 25°C, und (falls nötig) in Gegenwart von Katalysatoren, wie beispielsweise Triethylamin oder Natriumhydroxid durchgeführt. Durch Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wird das Produkt isoliert. Dieses Polymer dient im folgenden als Makroinitiator bei der Ethylenimin-Polymerisation. Dazu wird das Produkt mit der allgemeinen Formel VII mit
 - 30 Ethylenimin in wäßrigen oder polaren organischen Lösungsmittel bei Temperaturen von 0°C bis Siedetemperatur des Lösungsmittel umgesetzt. Das Molverhältnis der beiden Komponenten liegt zwischen 1 : 10 bis 1: 10.000. Bei dieser Reaktion

entsteht kein Nebenprodukt. Das Endprodukt läßt sich durch Fällen des Polymers in einem geeigneten Lösungsmittel, wie beispielsweise Diethylether isolieren.

Das unter d) beschriebene Verfahren führt man vorzugsweise so durch, daß man eine Verbindung mit der allgemeinen Formel IX mit einem geringen Überschuß,

- 5 beispielsweise einen 2 bis 10fachen Überschuß an Diisocyanat, vorzugsweise Hexamethyldiisocyanat, umsetzt. Die Reaktion wird in Chloroform bei Temperaturen von 20°C bis Siedetemperatur des Lösungsmittels, vorzugsweise aber bei Siedetemperatur des Lösungsmittels durchgeführt. Die Reaktionsdauer wird zwischen 2 und 24 Stunden gewählt, vorzugsweise jedoch 10 bis 14 Stunden. Die
- 10 Polymerkonzentration im Reaktionsansatzes liegt zwischen 10 g/l und 500 g/l, vorzugsweise 30 bis 150 g/l. Das Produkt wird durch Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck und Entfernen des überschüssigen Diisocyanates durch mehrfache Extraktion mit Petrolether (Siedebereich: 40-60°C) isoliert. Dieses Zwischenprodukt wird mit PEI-Makromolekül in einem Molverhältnis von 1 : 1 bis
- 15 100 : 1 umgesetzt. Die Reaktion wird in Chloroform und falls nötig mit einem Dimethylformamid-Zusatz bei Temperaturen von Raumtemperatur bis Siedetemperatur des Lösungsmittels, vorzugsweise aber bei 60 -70°C durchgeführt. Die Reaktionsdauer wird zwischen 6 und 72 Stunden gewählt, vorzugsweise jedoch 12 Stunden. Die Polymerkonzentrationen, sowohl die des PEI als auch die des mit
- 20 Hexamethyldiisocyanat aktivierten nichtionischen hydrophilen Polymers im Reaktionsansatzes liegen zwischen 10 g/l und 500 g/l, vorzugsweise zwischen 30 - 200 g/l. Das Produkt wird durch Ausfällen des Polymers in einem 10 - 30fachen Volumenüberschuß an Diethylether isoliert.

- 25 Im Vergleich zu PEI weisen die neuen Verbindungen folgende Eigenschaften auf:

Die Blockcopolymere weisen in Cytotoxizitätstests eine geringere Toxizität auf als PEI-Homopolymere und bleiben länger in Blutzirkulation (siehe Abschnitt „Biologische Beispiele“).

30

Die Blockcopolymere sind je nach Struktur mehr oder weniger oberflächenaktive Substanzen, die als Tenside Verwendung finden können.

Darüber hinaus können die Blockcopolymere auch

- in Klebstoff- und Lacksystemen als Additiv
 - als Fixiermittel zur Verbesserung der Papierfestigkeit
 - als Primer für Polymerverbundsysteme wie z. B. mehrlagige Verpackungsfolien
 - 5 • zur Kunststoffmodifizierung (Verbesserung der Anfärbbarkeit, Lackierbarkeit, Barrierewirkung)
 - zur Fixierung von Reaktivfarbstoffen auf Baumwolle
 - als Flockungs- und Dispergiermittel bei feinverteilten Schwebstoffen in industriellen Abwässern
 - 10 • zur Bindung von Schwermetallsalzen
 - zur Dispergierung organischer und anorganischer Pigmente
 - als Zusatz in keramischen und zementösen Bestandteilen
 - für verschiedenste Funktionen in der Haut- und Haarkosmetik sowie im Dentalbereich
 - 15 • zur Fixierung von medizinischen Wirkstoffen oder biologisch aktiven Verbindungen auf Oberflächen
 - zur Filtration von Endotoxinen und Pathogenen aus Blutplasma
 - zur Penetration durch Schleimhäute
- verwendet werden.

20

Zudem bilden die Blockcopolymere in wäßrigen Systemen Komplexe mit Polynukleinsäuren, wie DNA und RNA einschließlich Ribozymen. Aufgrund dieser Eigenschaft sind sie geeignet als Vehikel oder Vektoren für den Gentransfer (Penetration durch Zellmembranen und Translokation in den Zellkern). Sie können

25 daher in Transfektionsexperimenten, in der Gentherapie und Diagnostik Anwendung finden (siehe Abschnitt „Biologische Beispiele“).

Die folgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung, ohne daß diese darauf beschränkt wäre.

30

Chemische Beispiele

Beispiel 1:

5 Darstellung eines PEI(PEG)_n-Blockcopolymers

Aktivierung von mPEG-550

- In einem 100 ml Rundkolben mit Magnetrührstab, Rückflußkühler und aufgesetztem
- 10 Trockenrohr werden 10 ml Chloroform vorgelegt und mit 7 ml Hexamethyldiisocyanat (HMDI) (43,64 mmol, 8 eq.) versetzt. 3 g Polyethylenoxidmonomethylether (mPEG, $M_n = 550$ g/mol) (5,45 mmol, 1 eq.) werden in 40 ml Chloroform gelöst. Diese Lösung wird nun langsam unter Rühren zu der HMDI-Lösung getropft. Der Ansatz wird unter Rückfluß für 12 Stunden erhitzt.
- 15 Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das überschüssige HMDI mit Petrolether (40-60) (5 mal 50 ml) extrahiert. In nahezu quantitativer Ausbeute (3,8 g, 97%) wird das Produkt als farbloses dünnflüssiges Öl erhalten.

20 Darstellung eines PEI-graft-PEG Blockcopolymers

- In einem 100 ml Rundkolben mit Magnetrührstab, Rückflußkühler und aufgesetztem Trockenrohr werden 1,74 g bPEI ($M_w = 25$ kDa, $M_n = 10$ kDa, 0,1736 mmol, 1 eq.) eingewogen und mit 40 ml Dimethylformamid (DMF) in Lösung gebracht. 2,5 g des
- 25 mit HMDI aktivierten mPEGs ($M_n = 720$ Da, 3,47 mmol) werden in 10 ml Chloroform gelöst und diese Lösung wird unter Rühren langsam zur PEI-Lösung getropft. Der Ansatz wird für 12 Stunden auf 60 - 70 °C erhitzt. Anschließend wird der Ansatz in 500 ml Diethylether getropft. Nach zwei Stunden hat sich ein zähflüssiges gelbliches Öl abgesetzt. Der trübe Überstand wird verworfen und das Öl in 30 ml Ethanol
- 30 gelöst. Die Lösung wird wiederum in 500 ml Diethylether getropft und das erneut ausgefallene Öl durch Dekantieren isoliert. Das Produkt wird zum Filtrieren in Ethanol gelöst und im Vakuumtrockenofen bei 50°C von Lösungsmittel befreit. Es

werden 2,8 g eines gelblichen zähflüssigen bis harzartigen Öls erhalten (Ausbeute: 45%).

Die Charakterisierung der Polymere erfolgte mittels ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie. Die nachfolgenden Daten wurden für das Beispiel Nr. 1 erhoben. Sie gelten exemplarisch für die anderen Beispiele, für die ähnliche Daten erhoben worden sind.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 1,17 (Isocyanat- CH_2), 1,26 (Isocyanat- CH_2), 2,30 – 2,72 (Ethylenimin- CH_2), 2,96 (Isocyanat- CH_2), 3,15 (Isocyanat- CH_2), 3,49 Ethylenglykol- CH_2).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 14,3 (Isocyanat- CH_2), 26,2 (Isocyanat- CH_2), 29,6 (Isocyanat- CH_2), 36,2 (Isocyanat- CH_2), 37,5 (Ethylenimin- CH_2), 39,1 (Ethylenimin- CH_2), 41,1 (Isocyanat- CH_2), 47,2 (Ethylenimin- CH_2), 48,9 (Ethylenimin- CH_2), 52,8 (Ethylenimin- CH_2), 54,1 (Ethylenimin- CH_2), 58,7 (Isocyanat- CH_2), 69,3 und 70,2 und 71,6 (Ethylenglykol- CH_2), 156,2 ($-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$), 161,7 ($-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$).

GPC (Aminoethylmethacrylatgel, 1% Ameisensäure, 0,5 ml/min, 25°C, geeicht gegen Pullulan-Standards): M_n = 8800, M_w = 1640000, M_p = 85000, PD = 19,6, monomodal. Vergleich mit Blend aus PEI (Aldrich, 25kDa) und mPEG (Aldrich, 550 Da): M_n = 69000, M_w = 1480000, M_p = 99000 und 1100, PD = 2,1, bimodal.

Untersuchungen zur Grenzflächenaktivität des Polymers von Beispiel Nr. 1 wurden mit einem Tensiometer nach der Methode von Lecomte du Nouy (Ringmethode) bei 22°C durchgeführt. Es wurde die Grenzflächenspannung der Lösung gegen Luft gemessen. Die Eichung des Gerätes wurde mit Reinstwasser vorgenommen, das auch als Lösungsmittel für die Polymer-Probe eingesetzt wurde.

Meßdaten: σ_{\min} = 51 mN/m, CMC = 15 mg/ml.

In gleicher Weise können hergestellt werden: (alle Ausgangsverbindungen sind von Aldrich erhältlich)

Nr.	Ausgangsverbindungen / Homopolymere			
	Polyethylenimin	Hydrophiles, nicht ionisches Polymer	Molverhältnis PEI:PEG	Struktur des Blockcopolymers
2	IPEI M_n ca. 423	mPEG M_n ca. 550	1 : 1	AB-Diblock
3			1 : 2	ABA-Triblock
4	bPEI M_w ca. 800	mPEG M_n ca. 550	1 : 1	AB-Diblock
5			1 : 2	ABA-Triblock
6			1 : 4	sternförmig
7	bPEI M_w ca. 800	mPEG M_n ca. 5.000	1 : 1	AB-Diblock
8			1 : 2	ABA-Triblock
9			1 : 4	sternförmig
10	bPEI M_w ca. 2.000	mPEG M_n ca. 550	1 : 1	AB-Diblock
11			1 : 2	ABA-Triblock
12			1 : 4	sternförmig
13	bPEI M_w ca. 2.000	mPEG M_n ca. 5.000	1 : 1	AB-Diblock
14			1 : 2	ABA-Triblock
15	bPEI M_w ca. 25.000	mPEG M_n ca. 550	1 : 1	AB-Diblock
16			1 : 2	ABA-Triblock
17			1 : 4	sternförmig
18			1 : 20	sternförmig
19	bPEI M_w ca. 25.000	mPEG M_n ca. 2.000	1 : 1	AB-Diblock
20			1 : 2	ABA-Triblock
21			1 : 4	sternförmig
22			1 : 10	sternförmig
23	bPEI M_w ca. 25.000	mPEG M_n ca. 5.000	1 : 1	AB-Diblock
24			1 : 2	ABA-Triblock
25			1 : 4	sternförmig
26			1 : 10	sternförmig

Beispiel 27: Darstellung eines PEG(PEI)_n-Blockcopolymers

Aktivierung des verzweigten PEGs

- 5 In einem 100 ml Rundkolben mit Magnetrührstab, Rückflußkühler und aufgesetztem Trockenrohr werden 3,79 g HMDI (22,54 mmol, 80 eq.) in 10 ml Chloroform gelöst. Eine Lösung von 2 g eines achttarmig verzweigten PEG (bPEG, MW = 10 kDa, 0,2 mmol, 1 eq.) in 20 ml Chloroform wird unter Rühren langsam zu der HMDI-Lösung getropft. Der Ansatz wird für 4 Stunden zum Sieden erhitzt und bei Raumtemperatur
- 10 8 weitere Stunden nachgerührt. Unter vermindertem Druck wird das Lösungsmittel entfernt und das überschüssige HMDI mit Petrolether (40-60) extrahiert (3 mal 50 ml). Mit 58%iger Ausbeute (1,38 g) wird ein rötliches Öl erhalten.

Darstellung eines PEG-graft-PEI Blockcopolymeren

- 15 In einem 100 ml Rundkolben mit Magnetrührstab, Rückflußkühler und aufgesetztem Trockenrohr werden 2,20 g eines verzweigten PEIs (bPEI, M_w = 800 Da, M_n = 600 Da, 3,66 mmol, 25 eq.) in 20 ml Chloroform gelöst. Eine Lösung von 1,21 g des mit HMDI aktivierten bPEGs (M_n = 8,5 kDa, 0,14 mmol, 1 eq.) in 30 ml Chloroform wird
- 20 bei Raumtemperatur zur PEI-Lösung unter Rühren langsam zugetropft. Der Ansatz wird für 12 Stunden zum Sieden erhitzt. Die Lösung wird dann in 500 ml Diethylether langsam unter Rühren eingetropft. Nach 12 Stunden hat sich ein zähflüssiges gelbliches Öl abgesetzt. Der trübe Überstand wird verworfen und das Öl in 50 ml Ethanol gelöst. Die Lösung wird wiederum in 500 ml Diethylether getropft und das
- 25 erneut ausgefallene Öl durch Dekantieren isoliert. Das Produkt wird zum Filtrieren in Ethanol gelöst und im Vakuumtrockenofen bei 50°C von Lösungsmittel befreit. Es werden 1,13 g eines gelblichen zähflüssigen bis harzartigen Öls erhalten (Ausbeute: 59%).
- 30 Die Charakterisierung der Polymere erfolgte mittels ¹H-, ¹³C-NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie. Die nachfolgenden Daten wurden für das Beispiel Nr. 27 erhoben. Sie gelten exemplarisch für die anderen Beispiele, für die ähnliche Daten erhoben worden sind.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 1,22 (Isocyanat- CH_2), 1,36 (Isocyanat- CH_2), 2,40 – 2,70 (Ethylenimin- CH_2), 3,03 (Isocyanat- CH_2), 3,19 (Isocyanat- CH_2), 3,55 Ethylenglykol- CH_2).

- 5 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 25,9 (Isocyanat- CH_2), 29,4 (Isocyanat- CH_2), 39,2 (Ethylenimin- CH_2), 41,2 (Isocyanat- CH_2), 47,0 (Ethylenimin- CH_2), 48,9 (Ethylenimin- CH_2), 52,0 (Ethylenimin- CH_2), 54,2 (Ethylenimin- CH_2), 61,1 (Isocyanat- CH_2), 69,2 und 71,1 und 72,3 (Ethylenglykol- CH_2), 156,0 ($-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$), 162,1 ($-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$).

10

GPC (Aminoethylmethacrylatgel, 1% Ameisensäure, 0,5 ml/min, 25°C , geeicht gegen Pullulan-Standards): M_n = 22000, M_w = 43000, M_p = 31000, PD = 1,9, monomodal. Vergleich mit Blend aus 8arm PEG (Shearwater, 10 kDa) und PEI (Aldrich, 800 Da): M_n = 3100, M_w = 15000, M_p = 12000, PD = 4,91, monomodal.

15

Untersuchungen zur Grenzflächenaktivität des Polymers von Beispiel Nr. 27 wurden mit einem Tensiometer nach der Methode von Lecomte du Nouy (Ringmethode) bei 22°C durchgeführt. Es wurde die Grenzflächenspannung der Lösung gegen Luft gemessen. Die Eichung des Gerätes wurde mit Reinstwasser vorgenommen, das auch als Lösungsmittel für die Polymer-Probe eingesetzt wurde.

20

Meßdaten: σ_{\min} = 56 mN/m, CMC = 12 mg/ml.

In gleicher Weise können hergestellt werden:

Nr.	Ausgangsverbindungen / Homopolymere		
	Hydrophiles, nicht ionisches Polymer	Polyethylenimin	Struktur des Blockcopolymers
28	MPEG M_n ca. 5.000 (Aldrich)	IPEI M_n ca. 423 (Aldrich)	AB
29		bPEI M_n ca. 800 (Aldrich)	AB
30		bPEI M_n ca. 2.000 (Aldrich)	AB
31	LPEG M_n ca. 5.000 (Aldrich)	IPEI M_n ca. 423 (Aldrich)	ABA
32		bPEI M_n ca. 800 (Aldrich)	ABA

33		bPEI M_n ca. 2.000 (Aldrich)	ABA
34	4armPEG MW ca. 15.000 (Shearwater)	IPEI M_n ca. 423 (Aldrich)	AB ₄
35		bPEI M_n ca. 800 (Aldrich)	AB ₄
36		bPEI M_n ca. 2.000 (Aldrich)	AB ₄
37	8armPEG MW ca. 10.000 (Shearwater)	IPEI M_n ca. 423 (Aldrich)	AB ₈
38		bPEI M_n ca. 800 (Aldrich)	AB ₈
39		bPEI M_n ca. 2.000 (Aldrich)	AB ₈
40	Star-PEG 429 MW ca. 250.000 (Shearwater)	IPEI M_n ca. 423 (Aldrich)	AB ₁₃
41		bPEI M_n ca. 800 (Aldrich)	AB ₁₃
42		bPEI M_n ca. 2.000 (Aldrich)	AB ₁₃
43	α -Cyclodextrin (Aldrich)	IPEI M_n ca. 423 (Aldrich)	AB ₁₈
44		bPEI M_n ca. 800 (Aldrich)	AB ₁₈
45		bPEI M_n ca. 2.000 (Aldrich)	AB ₁₈
46	β -Cyclodextrin (Aldrich)	IPEI M_n ca. 423 (Aldrich)	AB ₂₁
47		bPEI M_n ca. 800 (Aldrich)	AB ₂₁
48		bPEI M_n ca. 2.000 (Aldrich)	AB ₂₁
49	γ -Cyclodextrin (Aldrich)	IPEI M_n ca. 423 (Aldrich)	AB ₂₄
50		bPEI M_n ca. 800 (Aldrich)	AB ₂₄
51		bPEI M_n ca. 2.000 (Aldrich)	AB ₂₄
52	PVA 80% hydrolysiert M_w = 9.000 - 10.000	IPEI M_n ca. 423 (Aldrich)	AB _n
53		bPEI M_n ca. 800 (Aldrich)	AB _n
54		bPEI M_n ca. 2.000 (Aldrich)	AB _n

Beispiel 55:

Darstellung eines PEG-PEI-Copolymers (Makroregleroute)

- 5 In einem 50 ml Rundkolben mit Magnetührstab und Rückflußkühler werden 1 g (0,2 mmol) eines monomethylierten PEG (MW 5000 g/mol), das an dem anderen Kettenende eine Aminogruppe trägt, eingewogen und in 20 ml destilliertem Wasser gelöst. Zu dieser Polymerlösung werden 2 ml (39 mmol) Ethylenimin zugesetzt. Die Polymerisation wird mit 200 µl (2 mmol) Dimethylsulfat als Initiator gestartet und der
- 10 Ansatz für 8 Tage auf 60°C erhitzt. Unter vermindertem Druck wird dann das Lösungsmittel entfernt, um die zurückbleibende Masse in 20 ml Ethanol wieder aufzulösen. Die Lösung wird in 250 ml Diethylether eingetropt, wobei das Polymer ausfällt. Durch Filtration wird das Polymer isoliert und für 3 Wochen bei 50 °C im Vakuumtrockenschrank von Lösungsmittelresten befreit. Es werden 1,9 g eines
- 15 schwach gelblichen, harzartigen Polymers erhalten (Ausbeute: 73%).

In gleicher Weise können hergestellt werden: (alle aminomodifizierten PEG sind von RAPP Polymere, Tübingen erhältlich)

Nr.	Ausgangsverbindungen			
	Polyethylenglykol	Polyethylenimin	Molverhältnis EG : EI	Struktur des Blockcopolymers
56	CH ₃ O-PEG-NH ₂ M _n ca. 2000	Ethylenimin	1 : 1	AB-Diblock
57			1 : 2	AB-Diblock
58			1 : 10	AB-Diblock
59	CH ₃ O-PEG-NH ₂ M _n ca. 5000	Ethylenimin	1 : 1	AB-Diblock
60			1 : 10	AB-Diblock
61	CH ₃ O-PEG-NH ₂ M _n 10.000	Ethylenimin	1 : 1	AB-Diblock
62			1 : 2	AB-Diblock
63			1 : 10	AB-Diblock
64	CH ₃ O-PEG-NH ₂ M _n 20.000	Ethylenimin	1 : 1	AB-Diblock
65			1 : 2	AB-Diblock

66			1 : 10	AB-Diblock
----	--	--	--------	------------

Die Charakterisierung der Polymere erfolgte mittels ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie. Die nachfolgenden Daten wurden für das Beispiel Nr. 56 erhoben. Sie gelten exemplarisch für die anderen Beispiele, für die sehr

5 ähnliche Daten erhoben werden.

^1H -NMR (500 MHz, D_2O): δ/ppm = 2,60 – 3,00 (Ethylenimin- CH_2), 3,78 (Ethylenglykol- CH_2).

10 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O): δ/ppm = 38,2 (Ethylenimin- CH_2), 39,9 (Ethylenimin- CH_2), 46,2 (Ethylenimin- CH_2), 47,9 (Ethylenimin- CH_2), 51,7 (Ethylenimin- CH_2), 53,4 (Ethylenimin- CH_2), 54,8 (Ethylenimin- CH_2), 70,2 (Ethylenglykol- CH_2).

GPC (Aminoethylmethacrylatgel, 1% Ameisensäure, 0,5 ml/min, 25°C, geeicht gegen
15 Pullulan-Standards): M_n = 21000, M_w = 40000, M_p = 16000, PD = 1,9, monomodal.
Vergleich mit $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$ (RAPP Polymere, 5000 Da): M_n = 9100, M_w = 14000, M_p = 16000, PD = 1,6, monomodal.

Beispiel 67:

20

Darstellung eines PEG-PEI-Copolymers (Makroinitiatorroute)

Darstellung des Makroinitiators

25 In einem 50 ml Rundkolben mit Magnetrührstab und Rückflußkühler werden 2 g (0,4 mmol, 1 eq.) eines Monomethylether-Polyethylenglykols (Aldrich, MW 5000) eingewogen und in 25 ml destilliertem Chloroform gelöst. 0,31 g Tosylchlorid (1,6 mmol, 4 eq.) werden der Polymerlösung unter Rühren zugesetzt. Abschließend werden 0,22 ml Triethylamin (0,16 g, 1,6 mmol, 4 eq.) als Katalysator dem Ansatz
30 zugegeben. Für 18 h wird der Ansatz unter Rückfluß erhitzt. Zur Isolierung und Reinigung des Polymers wird die Lösung in 500 ml Diethylether eingegossen. Das

ausgefällte Polymer wird abfiltriert, mit reichlich Diethylether nachgewaschen und im Vakuum getrocknet. Es werden 1,90 g einer weißen, flockigen Substanz erhalten (91% Ausbeute).

5 Darstellung des PEG-PEI-Blockcopolymers

- In einem 25 ml Rundkolben mit Magnetührstab und Rückflußkühler werden 0,5 g des Makroinitiators (0,096 mmol, 1 eq.) eingewogen und in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. Unter Rühren wird 1 ml Ethylenimin (0,832 g, 19,32 mmol, 200 eq.) zugetropft und der Ansatz für 24 h auf 60°C erhitzt. Die flüchtigen Bestandteile werden unter vermindertem Druck entfernt. Zurück bleibt eine weiße, harzartige Substanz, die mit 10 ml Wasser wieder in Lösung gebracht und mit 200 ml Tetrahydrofuran gefällt wird. Das Polymer wird durch Dekantieren isoliert und im Vakuum getrocknet. Es werden 0,95 g einer gelblichen, harzartigen Substanz erhalten (71% Ausbeute).

In gleicher Weise können hergestellt werden: (alle Monomethyl-PEG sind von Aldrich erhältlich)

Nr.	Ausgangsverbindungen			
	Polyethylenglykol	Polyethylenimin	Molverhältnis PEG : EI	Struktur des Blockcopolymers
68	CH ₃ O-PEG-Ts M _n ca. 550	Ethylenimin	1 : 10	AB-Diblock
69			1 : 50	AB-Diblock
70			1 : 200	AB-Diblock
71	CH ₃ O-PEG-Ts M _n ca. 750	Ethylenimin	1 : 10	AB-Diblock
72			1 : 50	AB-Diblock
73			1 : 200	AB-Diblock
74	CH ₃ O-PEG-Ts M _n ca. 2.000	Ethylenimin	1 : 10	AB-Diblock
75			1 : 50	AB-Diblock
76			1 : 200	AB-Diblock

77	CH ₃ O-PEG-Ts M _n ca. 5.000	Ethylenimin	1 : 10	AB-Diblock
78			1 : 50	AB-Diblock

Die Charakterisierung der Polymere erfolgte mittels ¹H-, ¹³C-NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie. Die nachfolgenden Daten wurden für das Beispiel Nr. 67 erhoben. Sie gelten exemplarisch für die anderen Beispiele, für die sehr ähnliche Daten erhoben werden.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ/ppm = 2,80 – 3,20 (Ethylenimin-CH₂), 3,80 (Ethylenglykol-CH₂).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ/ppm = 37,9 (Ethylenimin-CH₂), 39,4 (Ethylenimin-CH₂), 46,1 (Ethylenimin-CH₂), 47,2 (Ethylenimin-CH₂), 51,3 – 52,7 (Ethylenimin-CH₂), 70,2 (Ethylenglykol-CH₂).

GPC (Aminoethylmethacrylatgel, 1% Ameisensäure, 0,5 ml/min, 25°C, geeicht gegen Pullulan-Standards): M_n = 35000, M_w = 90000, M_p = 52000, PD = 2,6, monomodal. Vergleich mit CH₃O-PEG-Ts 5000 Da): M_n = 4800, M_w = 7600, M_p = 8600, PD = 1,6, monomodal.

Abkürzungen

bPEG	Verzweigtes Polyethylenglykol (branched)
bPEI	Verzweigtes Polyethylenimin (branched)
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration
DMF	Dimethylformamid
HMDI	Hexamethyldiisocyanat
IPEG	Lineares Polyethylenglykol (linear)
IPEI	Lineares Polyethylenimin (linear)
M _n	Zahlenmittel des Molekulargewichts
M _p	Peak-Molekulargewicht
mPEG	Monomethoxypolyethylenglykol

M_w	Gewichtsmittel des Molekulargewichts
MW	Unbestimmtes Molekulargewichtsmittel
PD	Polydispersität
Ts	Tosyl-
σ_{\min}	minimale Oberflächenspannung

Biologische Beispiele

5 I. Transfektionsexperimente

Die Transfektionseigenschaften der Polymere PEI(PEG)₂₀ (Beispiel 1) und PEG(PEI)₈ (Beispiel 27) wurden an der Zelllinie 3T3 untersucht. 50000 Zellen/well wurden in 12 well plates ausgesät und für 24 Stunden inkubiert (DMEM + 2mM Glutamin + 10% FKS, 37°C, 10% CO₂). Dann wurde das Medium gewechselt. Pro well wurden jeweils 4 µg pGL3-Plasmid in 100 µl 150mM Kochsalzlösung mit der entsprechenden Menge Polymer in 100 µl 150mM Kochsalzlösung komplexiert und nach 10 Minuten zu den Zellen gegeben. Nach 4 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt, nach 48 Stunden erfolgte die Auswertung. Die Luciferase-Expression wurde mit dem Luciferase Assay Kit von Promega auf einem Berthold Sirius Luminometer bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mit einem modifizierten BCA Assay quantifiziert. Die angegebenen Daten sind jeweils der Mittelwert von drei wells \pm Standardabweichung für die entsprechenden Stickstoff / Phosphor Quotienten.

20 Beispiel 1: [PEI(PEG)₂₀]

Meßdaten:

- N/P 5 : 0,0057 \pm 0,0036 ng / mg Protein
 N/P 10 : 0,1786 \pm 0,1522 ng / mg Protein
 N/P 20 : 0,6952 \pm 0,5498 ng / mg Protein
 25 N/P 50 : 5,1963 \pm 2,6863 ng / mg Protein
 (nur Plasmid: 0,0000 \pm 0,00004 ng / mg Protein)

Beispiel 27: [PEG(PEI)₈]

Meßdaten:

N/P 5 : 0,0024 ± 0,0012 ng / mg Protein

5 N/P 10 : 0,0045 ± 0,0046 ng / mg Protein

N/P 20 : 0,0109 ± 0,0078 ng / mg Protein

N/P 50 : 0,0765 ± 0,0498 ng / mg Protein

(nur Plasmid: 0,0000 ± 0,00004 ng / mg Protein)

- 10 In beiden Fällen konnte Genexpression aufgrund erfolgter Transfektion detektiert werden. Dabei weist das PEI(PEG)₂₀ eine deutlich höhere Transfektionseffizienz als das PEG(PEI)₈ auf.

II. In vitro-Zytotoxizitäts-Bestimmung mittels MTT-Assay:

15

- Die Copolymere der Beispiele 1 und 27 wurden bezüglich ihrer Zytotoxizität im Zellkulturmodell mittels MTT-Assay nach der Methode von Mosmann (J. Immunol. Methods. 65: 55-63 (1983)) untersucht. 8000 L929 Maus-Fibroblasten/well wurden in 96-wells 24 h lang vorinkubiert und mit den Polymerlösungen der verschiedenen
- 20 Konzentrationen 3, 12 und 24 h behandelt. Die Bestimmung der mitochondrialen Aktivität erfolgte durch die Umsetzung des MTT-Farbstoffs zum Formazan, welches spektrophotometrisch quantifiziert wurde. Die Polymere wurden als Lösungen in DMEM mit 10% FKS in fünf verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Falls
- 25 erforderlich, wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Proben sterilfiltriert (0,2 µm). Die Blends wurden durch Mischen der beiden Einzelkomponenten (abzüglich der Spacermenge) hergestellt. Zur Auswertung wurde die zelluläre Viabilität [%] gegen die eingesetzten Polymerkonzentrationen aufgetragen sowie die IC50 bestimmt.

30 Ergebnis:

- Die in vitro-Zytotoxizität der freien Polymere steigt mit steigender Polymerkonzentration und der Zunahme der Inkubationsdauer an.

- Copolymer des Beispiels 1: Die Toxizität der Mischung der Einzelkomponenten PEI 25 kDa und PEG 550 Da entspricht der Toxizität des freien PEI 25 kDa. Durch die kovalente Verknüpfung der beiden Komponenten verbessert sich die Verträglichkeit deutlich. Nach 24 h entspricht das Toxizitätsprofil zwar noch dem der Einzelkomponenten und damit dem freien PEI 25 kDa, bei kürzeren Inkubationsphasen dagegen sinkt die Zytotoxizität. Durch das PEG-Coating wird die positive Ladung des Polyethylenimins maskiert und damit die ladungsvermittelten Effekte auf die Zellmembranen reduziert.
- Copolymer des Beispiels 27: Die Mischung der beiden Einzelkomponenten PEI 700 Da und PEG 10 kDa zeigte bis zu 10 mg/ml keine Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen. Im gleichen Konzentrationsbereich zeigte das Copolymer eine erhöhte Einschränkung der zellulären Viabilität nach 3, 12 und 24 h, was mit dem Molekulargewichtsaufbau zu erklären ist.
- Im Vergleich weist Beispiel 27 eine geringere Zytotoxizität als Beispiel 1 auf.

15

II. In vitro-Zytotoxizitäts-Bestimmung mittels LDH-Assay:

L929 Maus-Fibroblasten wurden in der gleichen Zelldichte wie beim MTT-Assay in 6-well Multischalen ausgesät, 48 h vorinkubiert und mit den Polymerlösungen (in PBS pH 7,4) 1, 2, 3 und 6 h inkubiert. Der extrazelluläre LDH-Anteil wurde quantifiziert mit einem Standard-Kit (Sigma, DG-1340-K) durch photometrische Bestimmung der Reduktion von NAD in Gegenwart von Lactat und LDH. Zur Bestimmung des 100%-Wertes wurden Zellen mit 0,1% Triton-X 100 lysiert.

25

Ergebnis:

Der LDH-Assay bestätigt die Ergebnisse des MTT-Tests. Die Korrelation der beiden Assays zeigt, daß zunächst die Membranschädigung und zeitlich verzögert die Reduktion der metabolischen Aktivität einsetzt. Mit steigender Inkubationsdauer und Polymerkonzentration verstärkt sich die membranschädigende Wirkung der Polymere.

30

IV. DNA-Bindung der Copolymere bestimmt mittels Agarosegel-Elektrophorese:

Das Bindungsvermögen der Copolymere der Beispiele 1 und 27 wurde mit 1%igen Agarosegelen bei 80 V elektrophoretisch bestimmt. Die Lokalisierung der Plasmide (CMV-nlacZ) erfolgt mittels UV-Anregung bei 254 nm nach Ethidiumbromidfärbung.

Ergebnis:

- Beide Polymere sind in der Lage elektrostatisch mit dem Plasmid zu interagieren.
- Übereinstimmend mit dem Blend ist das Polymer des Beispiels 1 in der Lage Plasmid vollständig zu binden ab einem Stickstoff-PEI/Phosphat-DNA-Verhältnis (N/P-Ratio) von 1,7. Die beim Blend beobachtete Ethidiumbromidexklusion (ab N/P 5,8), ein Zeichen für intensive DNA-Kondenstation, ist bis N/P 23,0 für das Copolymer unvollständig.
- Während für den Blend des Beispiels 27 eine vollständige Plasmidbindung erst ab N/P 4,1 und keine völlige Ethidiumexklusion zu beobachten ist, zeigte das Copolymer Plasmidbindung ab N/P 2,4 und Exklusion des Farbstoffes ab N/P 16,6.

V. Erythrozyten-Aggregations-Assay

20

Erythrozyten wurden aus dem Citratblut von Wistar-Ratten nach der Methode von Parnham und Wetzig (Chem. Phys. Lipids, 1993, 64: 263-274) isoliert, in 24-Wells ausgesät und 2 h lang mit den Testlösungen bei 37°C inkubiert. Mikroskopisch wurde die Aggregation und Adhäsion der Erythrozyten unter dem Einfluß des Polymers untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte Erythrozyten.

Ergebnis:

- Freies Copolymer Beispiel 1 zeigte bei Konzentrationen von 0,27-18 µg/well im Vergleich zum Blend und zum PEI 25 kDa eine verringerte Aggregation und Adhäsion der roten Blutkörperchen an den Zellkulturschalen. Während bei niedrigen Konzentrationen (0,27-0,7 µg/well) keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren, ließ sich mit steigender Konzentration ein deutlicher

Unterschied zwischen Copolymer und Blend bzw. PEI 25 kDa detektieren. Der Aggregationseffekt steigt bei steigendem N/P-Verhältnis.

- Copolymer Beispiel 27 zeigte das gegenteilige Verhalten. Die Aggregation des Blends bzw. des freien PEIs ist schwächer ausgeprägt als die des Copolymers.
- 5 • Durch die Komplexierung mit Plasmid-DNA vermindert sich bei beiden Copolymeren die Aggregation der Erythrozyten signifikant im Vergleich zum freien Polymer.

VI. Hämolyse-Assay

10

Erythrozyten wurden aus dem Citratblut von Wistar-Ratten nach der Methode von Parnham und Wetzig (Chem. Phys. Lipids, 1993, 64: 263-274) isoliert, mit den Polymerlösungen versetzt und 1 h lang bei 37°C inkubiert. Die Erythrozyten werden durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 25°C, 700 g) und aus dem Überstand bei 540

15 nm das Hämolsat photometrisch vermessen.

Ergebnis:

- Die Einzelkomponenten PEG 8-arm, PEG 500 Da und PEI 700 Da zeigen im Konzentrationsbereich 0,001-10 mg/ml keine signifikanten hämolytischen Effekte
- 20 (alle 1-3%).
- Das Copolymer Beispiel 27 weist im gleichen Konzentrationsbereich ebenfalls keine ausgeprägten Effekte auf (<5%).
- Bei der Einzelkomponente PEI 25 kDa sowie dem Blend für Beispiel 1 steigt die hämolytische Aktivität bei 0,001-10 mg/ml an (22,13% bei 10 mg/ml).
- 25 • Das Copolymer Beispiel 1 zeigt bis zu 0,5 mg/ml eine ansteigende lytische Aktivität bis zu 13,30%, bei höheren Konzentration bis zu 10 mg/ml nimmt der hämolytische Effekt wieder ab (2,90% bei 10 mg/ml).

VI Pharmakokinetik und Organverteilung von Polymer-DNA-Komplexen in der Maus

Pharmakokinetik und Organverteilung der Copolymere Beispiel 1 und 27 wurden in 5 balb/c Mäusen bestimmt. Die Polymere wurden mit ^{125}I Bolton Hunter Reagenz (Pharmacia Biotech) radioaktiv markiert. Es wurden jeweils 0,4 bzw. 0,04 bzw. 0,008 mg PEI(-Anteil) pro kg Maus mit der entsprechenden Menge NF- κ B decoy Oligodeoxynucleotid (ODN) im Stickstoff / Phosphor Verhältnis N/P 3,5 bzw. N/P 6 in einem Gesamtvolumen von 80 μl in 5% Glucoselösung komplexiert und nach 10 10 Minuten den narkotisierten Mäusen über die Schlüsselbeinvene injiziert. Nach 20 Sekunden, 1, 2, 5, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten wurden Blutproben über einen Katheter aus der Arteria Aorta communis entnommen. Über einen Blasenkatheter wurde der Urin über 120 Minuten gesammelt. Nach 120 Minuten wurden die Mäuse dekapitiert und die Organe Cortex, Niere, Leber, Herz, Lunge, Milz und Fettgewebe 15 wurden entnommen. Die Polymermenge in den Proben wurde mittels Messung der Radioaktivität mit einem 1277 Gammamaster Automatic Gamma Counter (LKB Wallac) bestimmt.

Die Daten wurden mit dem Programm Kinetica 1.1 und einem 2-Kompartiment-Modell für i.v. Bolus-Injektion ausgewertet. Aus den Blutspiegelkurven wurden 20 Verteilungsvolumen (V_c), die Konstante für Elimination (k_{el}) und AUC berechnet. Bei drei auswertbaren Tieren sind Mittelwert \pm Standardabweichung, bei zwei Tieren der Median angegeben, bei nur einem Tier ist der Wert in Klammern aufgeführt.

Komplexherstellung und Dosierungen

25

Polymer	N/P	Dosis [mg/kg]	V_c [ml]	k_{el} [min^{-1}]	AUC [min $\mu\text{g ml}^{-1}$]
25 kDa PEI	3,5:1	0,4	23,39	0,106	4,89
Beispiel 1	3,5:1	0,4	(4,54)	(0,028)	(79,03)
Beispiel 27	3,5:1	0,4	5,84 \pm 0,4	0,104 \pm 0,017	16,86 \pm 1,64
25 kDa PEI	6:1	0,4	5,39	0,099	19,22

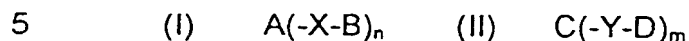
25 kDa PEI	6:1	0,04	1,37±0,2	0,14±0,026	6,22±1,18
25 kDa PEI	6:1	0,008	9,57±1,78	0,063±0,009	0,34±0,1
Beispiel 1	6:1	0,4	6,20	0,067	27,84
Beispiel 1	6:1	0,04	3,37±0,32	0,072±0,01	4,0±0,67
Beispiel 1	6:1	0,008	5,1±0,55	0,054±0,004	0,80±0,10
Beispiel 27	6:1	0,4	8,12	0,0593	21,72

Ergebnis:

- Beobachtungen bei niedrigerer Dosis deuten auf schwächere Toxizität des PEI(PEG)₂₀ gegenüber dem PEI 25 kDa hin.
- 5 ▪ Die Plasmaspiegel aller Polymere ließen sich mit einem 2-Kompartiment-Modell beschreiben.
- Die Copolymere haben eine höhere AUC sowie ein kleineres Verteilungsvolumen als das 25 kDa PEI. PEI(PEG)₂₀ (Beispiel 1) hat einen größeren Effekt als PEG(PEI)₈ (Beispiel 27).
- 10 ▪ Die Elimination war bei den Copolymeren verringert.
- V_c und k_{el} zeigen keine erkennbare Dosisabhängigkeit.
- Die berechnete AUC war für PEI 25 kDa und Beispiel 1 proportional zur Dosis, die Steigung der Geraden AUC/Dosis war bei Copolymer Beispiel 1 größer.
- Hauptorgane der Verteilung nach 120 Minuten waren Leber, Niere und Milz. Für
- 15 die 6:1 Komplexe zeigen die Copolymere im Vergleich zu PEI 25 kDa eine verringerte Aufnahme in Leber und Milz, sowie eine höhere Aufnahme in die Niere.

Patentansprüche

1. Verbindung der Formel I oder II

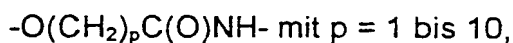
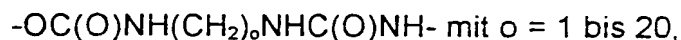


in welcher

10 A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10.000.000 g/mol steht;

B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol steht;

15 X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:



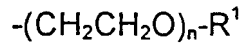
25



n für eine ganze Zahl 1 bis 200 steht;

30 C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol;

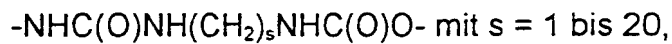
D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel



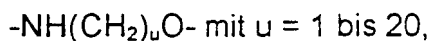
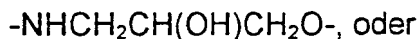
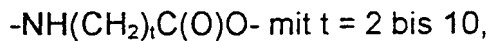
5 steht, worin $n' = 3$ bis 25.000 ist und R^1 Wasserstoff, ein aliphatischer Rest oder eine andere OH-Schutzgruppe oder ein zellulärer Ligand ist;

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

10



15



20

und

m für eine ganze Zahl von 1 bis 200 steht.

25

2. Verbindung gemäß Anspruch 1, in welcher

A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 1.000 bis 100.000 g/mol steht;

30

B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 400 bis 100.000 g/mol steht;

X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

-OC(O)NH(CH₂)_oNHC(O)NH- mit o = 2 bis 10,

-OC(O)NH(Aryl)NHC(O)NH- mit Aryl = aromatische Einheit mit einem Kern,

-O(CH₂)_pC(O)NH- mit p = 1 bis 3,

-OCH₂CH(OH)CH₂NH-,

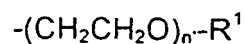
-OC(O)NH-, oder

-O(CH₂)_qNH- mit q = 1 bis 6,

n für eine ganze Zahl von 1 bis 50,

C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 400 bis 100.000 g/mol steht;

D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel



steht, worin n' = 10 bis 5.000 ist und R¹ Wasserstoff, ein aliphatischer Rest oder eine andere OH-Schutzgruppe oder ein zellulärer Ligand ist;

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

-NHC(O)NH(CH₂)_sNHC(O)O- mit s = 2 bis 10,

-NHC(O)NH(Aryl)NHC(O)O- mit Aryl = aromatische Einheit mit einem Kern,

-NH(CH₂)_tC(O)O- mit t = 2 bis 3,

-NHCH₂CH(OH)CH₂O-, oder

-NH(CH₂)_uO- mit u = 1 bis 6;

und

m für eine ganze Zahl von 1 bis 100 steht.

3. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, in welcher

A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 5.000 bis 50.000 g/mol steht;

B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 400 bis 50.000 g/mol steht;

X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

-OC(O)NH(CH₂)_oNHC(O)NH- mit o = 4 bis 6,

-OC(O)NH(Aryl)NHC(O)NH- mit Aryl = Toluy-,

-O(CH₂)_pC(O)NH- mit p = 1,

-OCH₂CH(OH)CH₂NH-,

-OC(O)NH-, oder

$-\text{O}(\text{CH}_2)_q\text{NH}-$ mit $q = 1$ bis 3 ;

n für eine ganze Zahl von 1 bis 12 steht;

5 C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 400 bis 50.000 g/mol steht;

D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel

10 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n'}-\text{R}^1$

steht, worin $n' = 10$ bis 1.000 ist und R^1 Wasserstoff, ein aliphatischer Rest oder eine andere OH-Schutzgruppe oder ein zellulärer Ligand ist;

15 Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

$-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_s\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ mit $s = 4$ bis 6 ,

20 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}(\text{Aryl})\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ mit Aryl = Toluyl-,

$-\text{NH}(\text{CH}_2)_t\text{C}(\text{O})\text{O}-$ mit $t = 2$,

$-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}-$, oder

25

$-\text{NH}(\text{CH}_2)_u\text{O}-$ mit $u = 1$ bis 3 ;

und

30 m für eine ganze Zahl von 1 bis 50 steht.

4. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, welche die Formel I aufweist.
5. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, welche die Formel II aufweist.
6. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, in welcher X für ein Brückenglied der Formel $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$ steht.
7. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5, in welcher Y für ein Brückenglied der Formel $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ steht.
8. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel I gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) Verbindungen der allgemeinen Formel V
- (V) $\text{A}-(\text{OH})_n$ mit A und $n =$ wie in Formel I
- mit Diisocyanat umgesetzt, oder
- b) Verbindungen der allgemeinen Formel VI
- (VI) $\text{A}-(\text{NH}_2)_n$ (mit A und $n =$ wie in Formel I definiert)
- bei der Polymerisation von Ethylenimin dem Reaktionsansatz von Beginn der Polyreaktion an oder erst später im Verlauf der Polyreaktion zufügt, oder
- c) Verbindungen der allgemeinen Formel VII

(VII) $A-(OS(O)_2R^4)_n$ mit A wie in Formel I und R^4 = aliphatischer oder aromatischer Rest als Makroinitiator für die Polymerisation von Ethylenimin einsetzt.

- 5 9. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel II gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der allgemeinen Formel IX

(IX) D-OH (mit D wie in Formel II definiert)

10

zunächst mit Diisocyanat und anschließend die erhaltene Verbindung mit linearem oder verzweigtem Polyethylenimin umsetzt.

10. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 als Tensid.
- 15

11. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Komplexierung von Polynukleinsäuren in wäßrigen Systemen.

- 20 12. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Komplexierung von DNA in wäßrigen Systemen.

13. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Komplexierung von RNA in wäßrigen Systemen.

25

14. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Komplexierung von Ribozymen in wäßrigen Systemen.

15. Zusammensetzung, die mindestens eine Nukleinsäure und eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 umfaßt.
- 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08G81/00 C12N15/87

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08G C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 204 196 A (SEKI KENJI ET AL) 20 April 1993 (1993-04-20) claim 1 column 1, line 63 -column 2, line 8 ---	1-3
A	WO 98 59064 A (KIRCHEIS RALF ; OGRIS MANFRED (AT); BRUNNER SYLVIA (AT); WAGNER ERN) 30 December 1998 (1998-12-30) cited in the application claims 1,5,7-10 ---	1
A	WO 92 07023 A (BEROL NOBEL AB) 30 April 1992 (1992-04-30) claims page 4, line 20 -page 5, line 2 --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November 2000

Date of mailing of the international search report

19/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Niaounakis, M

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 39 01 281 A (BAYER ERNST PROF DR) 19 July 1990 (1990-07-19) claim 1 ---	1
A	SIDOROV S. N. ET AL: "Stabilization of Metal Nanoparticles in Aqueous Medium by Polyethyleneoxide-Polyethyleneimine Block Copolymers" JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, vol. 212, no. 2, 1999, pages 197-211, XP002154207 abstract page 198, right-hand column, line 6 -page 199, left-hand column, line 4 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06214

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5204196 A	20-04-1993	JP 4270762 A	28-09-1992
WO 9859064 A	30-12-1998	DE 19726186 A	24-12-1998
		AU 8338598 A	04-01-1999
		EP 1003897 A	31-05-2000
WO 9207023 A	30-04-1992	SE 467309 B	29-06-1992
		AU 8749491 A	20-05-1992
		EP 0554324 A	11-08-1993
		JP 6502201 T	10-03-1994
		SE 9003364 A	23-04-1992
		US 5240994 A	31-08-1993
DE 3901281 A	19-07-1990	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06214

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C08G81/00 C12N15/87

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C08G C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 204 196 A (SEKI KENJI ET AL) 20. April 1993 (1993-04-20) Anspruch 1 Spalte 1, Zeile 63 -Spalte 2, Zeile 8	1-3
A	WO 98 59064 A (KIRCHEIS RALF ;OGRIS MANFRED (AT); BRUNNER SYLVIA (AT); WAGNER ERN) 30. Dezember 1998 (1998-12-30) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1,5,7-10	1
A	WO 92 07023 A (BEROL NOBEL AB) 30. April 1992 (1992-04-30) Ansprüche Seite 4, Zeile 20 -Seite 5, Zeile 2	1

	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Niaounakis, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 39 01 281 A (BAYER ERNST PROF DR) 19. Juli 1990 (1990-07-19) Anspruch 1 ---	1
A	SIDOROV S. N. ET AL: "Stabilization of Metal Nanoparticles in Aqueous Medium by Polyethyleneoxide-Polyethyleneimine Block Copolymers" JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, Bd. 212, Nr. 2, 1999, Seiten 197-211, XP002154207 Zusammenfassung Seite 198, rechte Spalte, Zeile 6 -Seite 199, linke Spalte, Zeile 4 -----	1

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06214

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5204196	A	20-04-1993	JP	4270762 A	28-09-1992
WO 9859064	A	30-12-1998	DE	19726186 A	24-12-1998
			AU	8338598 A	04-01-1999
			EP	1003897 A	31-05-2000
WO 9207023	A	30-04-1992	SE	467309 B	29-06-1992
			AU	8749491 A	20-05-1992
			EP	0554324 A	11-08-1993
			JP	6502201 T	10-03-1994
			SE	9003364 A	23-04-1992
			US	5240994 A	31-08-1993
DE 3901281	A	19-07-1990	KEINE		

11

11

7